

主論文の要旨

**Microphthalmia-Associated Transcription
Factor-Dependent Melanoma Cell Adhesion
Molecule Activation Promotes Peritoneal
Metastasis of Ovarian Cancer**

〔 MITF は MCAM の活性化を介して卵巣癌の腹膜播種を促進する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：梶山 広明 教授)

北見 和久

【緒言】

上皮性卵巣癌は半数以上が腹膜播種を伴う進行癌で診断されるため、婦人科癌の中で最も予後不良な癌である。卵巣癌の標準治療は積極的な腫瘍減量手術と全身化学療法である。しかし、腹膜播種を完全切除することは困難であり、残存した腫瘍が化学療法耐性を獲得して再燃、増大する。腹膜播種を伴う進行癌の5年生存率は40-50%程度であり、VEGF阻害薬、PARP阻害薬、免疫チェックポイント阻害薬など新規治療薬が導入された現在も依然として予後不良な疾患である。そのため新規治療法の開発は急務である。Microphthalmia-associated transcription factor(MITF)は悪性黒色腫の約20%、その他に腎明細胞癌、明細胞肉腫、胞巣状軟部肉腫などに認めるがん遺伝子、転写因子であり浸潤・転移に関与している。しかし卵巣癌におけるMITFの意義を検討した報告はない。そこで我々は、卵巣癌におけるMITFの機能解明を目的として本研究を行った。

【対象及び方法】

上皮性卵巣癌FFPE標本のMITF免疫染色と、臨床サンプルのWestern blottingによりMITF発現を評価し、予後との関連を検討した。卵巣癌細胞株10種のMITF発現と上皮間葉転換(EMT)との関連を、蛋白発現と形態学により評価した。またsiRNAを用いてMITF高発現株のMITF発現を抑制し、遊走・浸潤能を評価した。さらに大網由来ヒト腹膜中皮細胞上に卵巣癌細胞株を播種し、MITF発現と遊走能との関連を解析した。MITFと関連する蛋白を調べ、同定した蛋白の発現量と遊走・浸潤能の関連を調べた。

【結果】

FFPE標本のMITF免疫組織染色にて、卵巣癌組織におけるMITF発現を認めた(Fig.1A)。最も頻度の高い組織型である高異型度漿液性卵巣癌組織のWestern blottingにてMITF蛋白の発現を認めた(Fig.1C)。MITFの高発現は予後不良因子であった(Fig.1D, stageⅢの全生存率, $P = 0.002$, HR = 1.29 (1.1-1.52))。上皮細胞マーカーとしてE-cadherinを、間葉系細胞マーカーとしてN-cadherin, Vimentinを用い、卵巣癌細胞株10種をWestern blotting法で検証したところ、間葉系形質を示す細胞株はMITFを高発現しており(Fig.2B)、さらに間葉系形質の指標であるCell aspect ratio(長径/短径比)とMITF発現量の間には正の相関を認めた(Fig.2A-D, $R^2 = 0.21$)。MITF高発現卵巣癌細胞株であるES-2, NOEを用いて機能解析を行った。MITFの発現抑制により遊走・浸潤能が低下した(Fig.2E-H, $P < 0.05$)。さらに腹膜中皮細胞上の遊走能をタイムラプス観察にて評価すると、MITFの発現抑制により遊走速度($P < 0.05$)、遊走距離($P < 0.05$)ともに低下した(Fig.3)。MITFの標的遺伝子の中から遊走・浸潤に関与するMelanoma cell adhesion molecule(MCAM)に着目した。Flow Cytometry(FCM)にて、卵巣癌細胞株表面に膜蛋白であるMCAMの発現を認めた。MITF高発現卵巣癌細胞株においてMCAM発現が高く、MCAM発現量とCell aspect ratioに正の相関を認めた(Fig.4A and

4B, $R^2 = 0.31$)。続いて MITF と MCAM の相互関係を検証した。Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) 法と FCM にて、MITF の発現抑制により MCAM 発現が低下することを確認した (Fig.4C and 4D, $P < 0.05$)。MCAM 発現抑制により卵巣癌細胞株の遊走・浸潤能は有意に低下し (Fig.4E-H)、MCAM の高発現も予後不良因子として同定された (Fig.4I, stage III の全生存率, $P = 0.0011$, HR = 1.29 (1.11-1.55))。

【考察】

本研究は、卵巣癌の進展における MITF の機能解析を行った初めての報告である。MITF が卵巣癌に発現しており、MCAM の発現制御を介して遊走・浸潤に寄与することを示した。さらに MITF・MCAM の高発現はともに予後不良因子であることを示した。

上皮性卵巣癌の約 33% と最も多い組織型である高異型度漿液性卵巣癌の MITF 免疫組織染色を実施し、約 7 割の症例が陽性であった。また公開データベースを用いた予後解析から MITF の高発現は卵巣癌の予後不良因子であった。転移・浸潤の際に、腫瘍細胞は EMT と呼ばれる上皮系形質から間葉系形質への形質転換を起こす。EMT を起こした腫瘍細胞は高い遊走能と浸潤能を獲得することが知られている。我々は、間葉系細胞に特徴的な蛋白発現 (E-cadherin, N-cadherin, Vimentin) と細胞形態を持つ卵巣癌細胞株において MITF の発現が高いことを示した。さらに MITF が、腹膜播種形成において重要な腹膜中皮細胞上での遊走に寄与していることを示した。これらのことから MITF が卵巣癌の遊走能・浸潤能において重要な役割を持つ可能性が示唆された。

MCAM は別名 CD146 と呼ばれる膜貫通型細胞接着分子であり、卵巣癌を含む固形癌において遊走・浸潤に関与すると報告されている。しかし卵巣癌における MCAM 発現の制御メカニズムは不明であった。我々は、MITF 高発現卵巣癌細胞株が MCAM を高発現していること、siRNA による MITF 発現抑制が MCAM の mRNA と膜表面の MCAM 発現を抑制することから、MCAM 発現が MITF に制御されていることを示した。さらに MCAM 高発現が卵巣癌の予後不良因子であることを示した。

MITF 阻害剤や、抗 MCAM 抗体薬、MCAM 阻害の miRNA など研究開発されており、今回我々の同定した MITF-MCAM は、卵巣癌の予後予測因子として利用できる可能性と、新規治療標的にできる可能性を有している。

【結論】

卵巣癌において MITF は MCAM の活性化を介して遊走・浸潤に関与し、腹膜播種転移に寄与している。MITF と MCAM は新たな卵巣癌の治療標的となる可能性が示唆された。